



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 102 61 192.0

Anmeldetag: 20. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: BASF AG, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide

IPC: C 12 Q 1/32

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schmidt C.

Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Malat Dehydrogenase, welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt und durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent dieser Nukleinsäuresequenz kodiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden neue Nukleinsäuresequenzen umfassend die SEQ ID NO:2 sowie funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:2 bereitgestellt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend genannten Malat Dehydrogenase sowie deren funktioneller Äquivalente in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung sowie die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

10 Das grundlegende Prinzip, Herbizide über Inhibierung eines definierten Targets zu identifizieren ist bekannt (z.Bsp. US 5,187,071, WO 98/33925, WO 00/77185). Generell besteht ein großer Bedarf, Enzyme zu detektieren, welche neue Targets für Herbizide darstellen könnten. Gründe hierfür sind auftretende Resistenzproblematiken von an bereits bekannten Targets wirkenden herbiziden Wirkstoffen und das ständige Bemühen neue herbizide Wirkstoffe zu identifizieren, die sich durch einen möglichst breiten Wirkungsbereich, ökologische und toxikologische Verträglichkeit und/oder geringe Aufwandmengen auszeichnen.

20 Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines Stoffwechselweges ist, häufig das Wachstum der Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen, dass die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Existenz nicht bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht limitierend für den Stoffwechselweg ist. Ferner zeichnen sich pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz aus. Im Genom von Arabidopsis thaliana liegen funktional äquivalente Enzyme im Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamilien vor (Nature, 2000, 408(6814):796-815). Diese Annahme wird experimentell bestätigt durch die Tatsache, dass grosse Gen-Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in Arabidopsis bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als erwartet (Curr. Op. Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

30

Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines Stoffwechselweges ist, häufig das Wachstum der Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen, dass die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Existenz nicht bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht limitierend für den Stoffwechselweg ist. Ferner zeichnen sich pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz aus. Im Genom von Arabidopsis thaliana liegen funktional äquivalente Enzyme im Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamilien vor (Nature, 2000, 408(6814):796-815). Diese Annahme wird experimentell bestätigt durch die Tatsache, dass grosse Gen-Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in Arabidopsis bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als erwartet (Curr. Op. Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

45

E/R

2

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, neue Targets zu identifizieren, die für das Wachstum von Pflanzen essentiell sind bzw. deren Inhibierung für die Pflanze zu einem verminderten Wachstum führen, sowie Verfahren bereitzustellen, 5 welche zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider und/oder wachstumsregulatorischer Wirkung geeignet sind.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden.

10

An dieser Stelle werden nun weitere der in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

"Affinitäts-Tag": Bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen 15 kodierende Nukleinsäuresequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz direkt oder mittels eines Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient zur Isolierung, Anreicherung und/oder gezielten Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins mittels Affinitäts-Chromatographie aus Gesamtzellextrakten. Der oben erwähnte Linker kann 20 vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf vom Zielprotein abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag" z.B. von Quiagen, Hilden, "Strep-Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer Chitin 25 bindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, das Maltose-bindende Protein (pMal) von New England Biolabs und das sogenannte CBD-Tag von Novagen. Der Affinitäts-Tag kann dabei am 5'- oder 3'-Ende der kodierenden Nukleinsäuresequenz mit der für das Zielprotein kodierenden Sequenz angebracht 30 sein.

"Biologische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase": Dieser Begriff beschreibt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, 35 daß durch die Präsenz der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase Wachstums- und Überlebensfähigkeit vermittelt wird. Wird die Aktivität eines Proteins mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase gehemmt, so führt dies zu einem verminderten Wachstum, einem Wachstumsstillstand oder einem Absterben der Pflanze. 40

"Enzymatische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase": Der Begriff enzymatische Aktivität beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms, ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln. Die enzymatische 45 Aktivität kann in einem sogenannten Aktivitätstest über die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) oder die Abnahme eines spezifischen Cofaktors oder über eine Kom-

3

mination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

"Enzymatische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase" bezeichnet hier die Fähigkeit eines Enzyms, eine von der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase katalysierte Reaktion ebenfalls zu katalysieren.

"Expressionskassette": Eine Expressionskassette enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Kontrollelement, wie einem Promotor, sowie vorteilhaft mit einem weiteren Kontrollelement, wie einem Terminator. Die Nukleinsäuresequenz der Expressionskassette kann beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon sein. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extra-chromosomal oder integriert in das Genom vorliegen. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Auch artifizielle Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression eines durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptides mit der enzymatischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase, vorzugsweise der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung des von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.

Alle vorstehend erwähnten Nukleotid-Sequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragment-Kondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L.

Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

"Funktionelle Verknüpfung": Unter einer funktionellen oder operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung regulativer Sequenzen bzw. genetischer Kontrollelemente derart, daß jede der regulativen Sequenzen bzw. jedes der genetischen Kontrollelemente ihre Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

"Funktionelle Äquivalente" beschreiben hier Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder Teilen der SEQ ID NO:2 hybridisieren und befähigt sind, die Expression eines Polypeptides mit der enzymatischen, vorzugsweise biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.

Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10-50 bp, vorzugsweise 15-40 bp beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einer Länge von 100-500 bp oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure/Oligonukleotid, der Länge des Fragmentes oder der vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart, d.h. DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC; 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese

5

angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Unter einem funktionellen Äquivalent der SEQ ID NO:2 versteht man weiterhin auch Nukleinsäuresequenzen die mit der SEQ ID NO:2 bis zu einem definierten Prozentsatz homolog bzw. identisch sind und ferner insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit der enzymatischen, vorzugsweise biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase kodieren.

Es werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen erhält. Beispielshaft können solche Modifikationen durch dem Fachmann geläufige Techniken, wie "Site Directed Mutagenesis", "Error Prone PCR", "DNA-shuffling" (Nature 370, 1994, pp.389-391) oder "Staggered Extension Process" (Nature Biotechnol. 16, 1998, pp.258-261) erzeugt werden. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Einfügung weiterer Restriktionsenzymchnittstellen, die Entfernung von DNA zur Verkürzung der Sequenz, der Austausch von Nukleotiden zur Codon-Optimierung oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen sein. Proteine, die über modifizierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, müssen trotz abweichender Nukleinsäuresequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.

Der Begriff des funktionellen Äquivalents kann sich auch auf das durch die entsprechende Nukleinsäuresequenz kodierte Aminosäuresequenz beziehen. In diesem Fall beschreibt der Begriff funktionelles Äquivalent ein Protein, dessen Aminosäuresequenz mit der

SEQ ID NO:3 bis zu einem definierten Prozentsatz identisch bzw. homolog ist.

Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

10 "Genetische Kontrollsequenz" beschreibt Sequenzen, die einen Einfluss auf die Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen haben. Beispiele hierfür sind Promotoren, Terminatoren oder sogenannte "enhancer" Sequenzen. Zusätzlich zu diesen Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des Zielgens modifiziert, also erhöht oder erniedrigt wurde. Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, sowie die Chromatinstruktur beeinflussende Sequenzen (z.B. Matrix attachment regions (MAR's)) die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135), Kälte- und Trockenstress (Plant Cell 1994, (6): 251-264) und Hitzestress (Molecular & General Genetics, 1989, 217(2-3): 246-53) beschrieben.

"Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus BESTFIT (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA unter Einstellung folgender Parameter für Polypeptide

7

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

und folgender Parameter für Nukleinsäuren

5

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

Average Match: 10.000

Average Mismatch: -9.000

berechnet wird.

10

Anstelle des Begriff "homolog" oder "Homologie" wird im Folgenden auch gleichbedeutend der Begriff Identität verwendet.

15

"Mutationen" von Nuklein- oder Aminosäuresequenzen umfassen Substitutionen (=Ersetzungen), Additionen (Hinzufügung), Deletionen (Löschung), Inversion (Veränderungen) oder Insertionen (Einfügungen) eines oder mehrerer Nukleotidreste, wodurch sich auch die entsprechende Aminosäuresequenz des Zielproteins mittels Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren verändern kann, wobei jedoch insgesamt die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins im wesentlichen beibehalten werden.

20

25

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an 5'- oder 3'-Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 100 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 bp.

30

35

"Pflanzen" im Sinne der Erfindung sind Pflanzenzellen, -gewebe, -organe oder ganzen Pflanzen wie Samen, Knollen, Blüten, Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel oder sonstige Pflanzenteile zu verstehen. Außerdem ist unter Pflanzen Vermehrungsmaterial wie Samen, Früchte, Sämlinge, Stecklinge, Knollen, Schnitte oder Wurzelstöcke zu verstehen.

40

"Reaktionszeit" bezeichnet die Zeit, die man für die Durchführung eines Testes zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine enzymatische Aktivität benötigt und hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf photometrischen Methoden basierenden Verfahren zur Identifizie-

45

rung von Verbindungen mit herbizider Wirkung liegen die Reaktionszeiten beispielsweise im allgemeinen zwischen > 0 bis 120 Minuten.

- 5 "Rekombinante DNA" beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen herstellbar durch rekombinante DNA-Technologie.

"Rekombinate DNA-Technologie": allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (z.B. beschrieben in Sambrook et
10 al., 1989, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

"Replikationsursprünge" gewährleisten die Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen und Hefen z.B. der pBR322 ori oder der P15A ori in E. coli
5 (Sambrook et al.: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und der ARS1 ori in Hefe (Nucleic Acids Research, 2000, 28(10): 2060-2068).

20

"Reportergene" kodieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der
25 Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Gerdes HH and Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389(1):44-47; Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luziferase (Giacomin, Plant Sci 1996, 116:59-72; Scikantha, J Bact 1996, 178:121; Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992
30 10:324-414), sowie Luziferasegene, im allgemeinen die β -Galactosidase oder die β -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das Ura3-Gen.
35

"Selektionsmarker" verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika, oder andere toxische Verbindungen: Beispielhaft zu nennen seien
40 hier das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin, Paromycin (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das sul Gen kodierend für eine mutierte Dihydropteroat Synthase (Guerineau F et al., Plant Mol Biol. 1990; 15(1):127-136), das Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193)
45 und das shble Resistenzgen, das eine Resistenz gegen die Bleomycin Antibiotika wie zB. Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für

Selektionsmarker-Gene sind Gene, die eine Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinotricin etc. verleihen oder solche, die eine Antimetaboliten-Resistenz verleihen, zum Beispiel das dhfr-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 5 13 (1994) 142-149). Geeignet sind ferner Gene wie trpB oder hisD (Hartman SC and Mulligan RC, Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8047-8051). Geeignet ist auch das Gen der Mannose-Phosphat Isomerase (WO 94/20627), das ODC (Ornithin-Decarboxylase) Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Bio- 10 logy, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.) oder die Deaminase aus Aspergillus terreus (Tamura K etal., Biosci Biotechnol Biochem. 59 (1995) 2336-2338):

"Transformation" beschreibt einen Prozess zur Einführung hetero- 15 loger DNA in eine pro- oder eukaryontische Zelle. Mit einer transformierten Zelle ist nicht nur das Produkt des Transformationsprozesses an sich beschrieben, sondern auch alle transgenen Nachkommen des durch die Transformation hergestellten transgenen Organismus

20 "Target/Target Protein": ein Polypeptid codiert über die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, welches ein Enzym im klassischen Sinne sein kann oder z.B. ein Strukturprotein, ein für Entwicklungsprozesse relevantes Protein, Regulationsproteine wie Trans- 25 kriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Untereinheiten von Kanälen, Transportproteine, regulatorische Untereinheiten die einem Enzymkomplex eine substrat- oder Aktivitätsregulation verleihen. Allen Targets oder Wirkorten gemein ist dabei, dass deren funktionale Anwesenheit essentiell für das Überleben 30 oder die normale Entwicklung und das Wachstum sind.

"Transgen": Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expres- sionskassette oder einen Vektor enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit der 35 vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor beschreibt der Ausdruck transgen alle solche durch gentechnische Methoden hergestellten Konstruktionen, in denen sich entweder die Nukleinsäuresequenz des Zielproteins oder eine mit der Nukleinsäuresequenz des Zielproteins funktionell ver- 40 knüpfte genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der vorstehend genannten Möglichkeiten sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden. Die Modifikation kann hier beispiels- 45 weise über Mutation eines oder mehrerer Nukleotidreste der entsprechenden Nukleinsäuresequenz erreicht werden.

10

Malat Dehydrogenase katalysiert die reversible, Pyridinnukleotid-abhängige Umsetzung von Oxalacetat und Malat. Aufgrund der Umsetzung dieser bedeutenden Metabolite des Primärstoffwechsels hat die von der Malat Dehydrogenase katalysierte Reaktion für diverse Prozesse eine Bedeutung (Review in Faske et al. 1997, Plant Physiology 115, 705-715). NAD⁺-abhängige Malat Dehydrogenasen sind in Mitochondrien, Micorbodyes wie Peroxysomen oder Glyoxysomen und dem Zytosol sowie in Wurzelknöllchen zu finden, während Chloroplasten eine NADP⁺-abhängige Malat Dehydrogenase enthalten, die lichtabhängig reguliert wird. Malat Dehydrogenasen werden in Arabidopsis durch eine Genfamilie codiert. Die einzelnen Isoformen enthalten spezifische N-terminale Transitsequenzen für einen Transport in die Chloroplasten, Mitochondrien und Microbodyes. Ferner finden sich Sequenzen für Malat Dehydrogenasen, die aufgrund fehlender Transitpeptide vermutlich im Zytosol verbleiben. Für Malat Dehydrogenasen codierende Sequenzen wurden aus verschiedenen C3- und C4-Pflanzen isoliert (siehe Miller et al. 1998 Plant Journal 15, 173-184). Bekannt sind für glyoxysomalen Malat Dehydrogenase kodierende Nukleinsäuresequenzen sowie Proteinsequenzen aus Wassermelone (P19446, Swissprot; Identität zur SEQ ID NO:2 = 77,5%; Identität zur Seq ID NO:3 = 85,4%), Gurke, Arabidopsis, Soya und Reis.

Die Antisense-Inhibierung einer cytosolischen Malat Dehydrogenase in Kartoffel auf bis zu 40% Restaktivität führte zu keinen ausgeprägten Wachstumsphänotypen und keinem verringertem Knollenertrag (Jenner et al. 2001, Plant Physiology 126, 1139-1149). Nach Faske et al. (1997, Plant Physiology 115, 705-715) beeinflusst die Verringerung der Expression einer plastidären Malat Dehydrogenase aus Tabak durch Antisense und Cosuppression in transgenen Tabakpflanzen selbst bei stark verringerter Malat Dehydrogenase-Expression (< 20% Restaktivität) die Vitalität der transgenen Pflanzen nicht. Beobachtet wurde nur ein geringe Veränderungen bezüglich der Wachstumsparameter (Frischgewicht, Trockengewicht). Die versuchte Überexpression einer plastidären Malat Dehydrogenase aus Sorghum in der C4-Pflanze Flaveria führte durch Cosuppression zur drastischen Inhibierung der Malat Dehydrogenase-Aktivität auf 5-50% Restaktivität (Trevanion et al. 1997, Plant Physiology 113, 1153-1165) ohne signifikante Einflüsse auf die Vitalität der Pflanzen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass Pflanzen, in denen gezielt glyoxysomale Malat Dehydrogenase verringert wurde, Phänotypen aufwiesen, die mit durch Herbizidapplikation erzeugten Phänotypen vergleichbar sind. Be-

11

obachtet wurden drastische Wachstumsretardierungen und Schädigungen wie Chlorosen und Nekrosen.

Obgleich cytosolische und plastidäre Malat Dehydrogenase für
5 Pflanzen nicht essentiell ist, können diese Enzyme prinzipiell
auch zur Bestimmung von Inhibitoren der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase herangezogen werden, da die durch die cytosolische und
plastidäre Malat Dehydrogenase katalysierte Reaktion die gleiche
ist wie die durch die glyoxysomalen Malat Dehydrogenase kataly-
10 sierte.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Ma-
lat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Her-
biziden, vorzugsweise von pflanzlicher Malat Dehydrogenase, be-
15 sonders bevorzugt von pflanzlicher Malat Dehydrogenase kodiert
durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten
Nukleinsäuresequenz; oder
20
- b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten
Nukleinsäuresequenz; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten
genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID
25 NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten
genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz
eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine
30 Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist,
ableiten läßt,

wobei sich die funktionellen Äquivalente nach c) und d) sich
35 durch eine gleiche Funktionalität auszeichnen, d.h. sie haben die
enzymatische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase.

Das erfindungsgemäße funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:3 ge-
mäß d) weist eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens
40 63%, 64%, 65%, 66% vorzugsweise mindestens 67%, 68%, 69%, 70%,
71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%,
79%, 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens
94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

12

Besonders bevorzugt ist die Verwendung von glyoxysomaler Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend

5 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

10

c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

5 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

20

Die funktionellen Äquivalente nach d) zeichnen sich durch eine gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die biologische Funktion einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase.

25 Die oben genannten Nukleinsäuresequenzen stammen vorzugsweise aus einer Pflanze.

Das erfindungsgemäße funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:3 gemäß d) weist eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 66%, 67%, 68% vorzugsweise mindestens 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% vorzugsweise mindestens 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

35

Weiterhin werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuresequenzen beansprucht kodierend für eine pflanzliche glyoxysomalen Malat Dehydrogenase umfassend:

40 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

45

13

- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 5 d) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2; oder
- 10 e) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

15 Ebenfalls beansprucht werden die durch die vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen kodierten Polypeptide. Die funktionellen Äquivalente nach c) und d) zeichnen sich durch eine gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die enzymatische, vorzugsweise biologische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase.

20

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:2 von mindestens 79%, 80%, 81%, 82%, 83% vorzugsweise mindestens 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, bevorzugt mindestens 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% besonders

25 bevorzugt mindestens 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:3 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:3 von mindestens 87%, 88%, 89%, 89% vorzugsweise mindestens 90%, 91%, 92%, 93% bevor-

30 zugt mindestens 94%, 95%, 96% besonders bevorzugt mindestens 97%, 98%, 99% auf.

Der im folgenden verwendete Begriff "erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen" steht für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine

35 Malat Dehydrogenase, vorzugsweise für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine planzliche Malat Dehydrogenase, besonders bevorzugt für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine planzliche Malat Dehydrogenase umfassend

40 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

45

14

c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

5 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt,

10

ganz besonders bevorzugt für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine pflanzliche glyoxysomale Malat Dehydrogenase umfassend

a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

20 c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

Die durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptide mit der enzymatischen, vorzugsweise biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase werden im folgenden der Einfachheit halber als "MDH" bezeichnet. Der Begriff "Malat Dehydrogenase" bezeichnet jedes Protein/Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Malat Dehydrogenase.

Glyoxysomale MDHs verursachen in reduzierter Menge Wachstumsretardierungen sowie nekrotische und chlorotische Blätter in Pflanzen.

40

Die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue Targets für Herbizide dar, welche die Bereitstellung neuer Herbizide zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen ermöglichen. Des weiteren stellen die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren

45 stellen neue Targets für Wachstumsregulatoren dar, welche die Be-

15

reitestellung neuer Wachstumsregulatoren zur Regulation des Wachstums von Pflanzen ermöglichen.

Unter unerwünschten Pflanzen sind im weitesten Sinne alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind, zum Beispiel:

Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*,
10 *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*,
Polygonum, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*,
Rorippa, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*,
Emex, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*,
Ranunculus, *Taraxacum*.

15

Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*,
Panicum, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*,
Lolium, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*,
20 *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*,
Sphenoclea, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Apera*.

Die SEQ ID NO:2 oder Teile der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen können für die Herstellung von Hybridisierungs-
25 sonden verwendet werden. Die Herstellung dieser Sonden sowie die Durchführung der Experimente ist bekannt. Sie kann zum Beispiel über die gezielte Herstellung radioaktiver oder nicht radioaktiver Sonden mittels PCR und der Verwendung von entsprechend markierten Oligonukleotiden mit anschließenden Hybridisierungsexperimenten
30 erfolgen. Die hierfür erforderlichen Technologien sind beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) aufgeführt. Die entsprechenden Sonden können weiterhin mittels Standardtechnologien (Lit. SDM bzw.
35 random Mutagenesis) so modifiziert werden, dass sie für weitere Zwecke eingesetzt werden können, z.B. als Sonde, die spezifisch zu mRNA sowie den entsprechenden codierenden Sequenzen hybridisiert zwecks Analyse der entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen.

40

Die oben genannten Sonden können für die Detektion und Isolation von funktionellen Äquivalenten der SEQ ID NO:2 aus anderen Pflanzenspezies aufgrund von Sequenzidentitäten verwendet werden.

Hierbei wird ein Teil oder die gesamte Sequenz der entsprechenden

45 SEQ ID NO:2 als Sonde zum Screening in einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Pflanzenspezies oder in einer Compu-

16

ter-Recherche nach Sequenzen funktioneller Äquivalente in elektronischen Datenbanken verwendet.

Bevorzugte Pflanzenspezies sind hierbei die bereits eingangs erwähnten unerwünschten Pflanzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Expressionskassetten enthaltend

10 a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz umfassend

i. eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

ii. eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

iii. funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2;

iv. eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 92% aufweist, ableiten läßt.

b) zusätzliche Funktionselemente; oder

c) eine Kombination aus a) und b);

sowie die Verwendung von Expressionskassetten enthaltend

a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz;

b) zusätzliche Funktionselemente; oder

c) eine Kombination aus a) und b);

17

zur Expression einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH, die in vitro Testsystemen verwendet werden kann. Beide Ausführungsformen der vorstehend beschriebenen Expressionskassetten werden im folgenden als erfindungsgemäße Expressionskassette bezeichnet.

5

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette am 5'-Ende der kodierenden Sequenz einen Promotor und am 3'-Ende Transkriptions-Terminations-Signal und gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, welche mit
10 der dazwischenliegenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft sind.

Unter den erfindungsgemäßen Expressionskassetten sind auch Analoga zu verstehen, die zum Beispiel durch eine Kombination der
15 einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Kotransformation) oder durch sequenzielle Transformation zustande kommen können.

20 Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen nach Punkt a) für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder für Vektoren enthaltend erfindungsgemäße Expressionskassetten sind beispielsweise Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -PR- oder im λ -PL-Promotor, die
25 zur Expression einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH, in gramnegativen Bakterienstämmen verwendet werden können.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren amy und SPO2, die zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in gram-positiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotoren AUG1, GPD-1, PX6, TEF, CUP1, PGK, GAP1, TPI, PHO5, AOX1, GAL10/CYC1, CYC1, OliC, ADH, TDH, Kex2, Mfa oder NMT oder Kombinationen der vorstehend genannten Promotoren enthalten (Degryse
30 et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Romanos et al. Yeast 1992 Jun;8(6):423-88; Benito et al. Eur. J. Plant Pathol. 104, 207-220 (1998); Cregg et al. Biotechnology (N Y) 1993 Aug;11(8):905-10; Luo X., Gene 1995 Sep 22;163(1):127-31; Nacken et al., Gene 1996 Oct 10;175(1-2): 253-60; Turgeon et al., Mol
40 Cell Biol 1987 Sep;7(9):3297-305) oder den Transkriptionsterminatoren NMT, Gcyl, TrpC, AOX1, nos, PGK oder CYC1 (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Brunelli et al. Yeast 1993 Dec9(12): 1309-18; Frisch et al., Plant Mol. Biol. 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., Biotechnology (N.Y.) 12 (2),
45 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number : AF049064; Punt et al., (1987) Gene 56 (1),

117-124), die zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in Hefestämmen verwendet werden können.

Als zur Expression in Insektenzellen geeignete genetische Kontrollsequenzen sind exemplarisch der Polyhedrin-Promotor sowie der p10-Promotor (Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1988) Bio/Techn. 6, 47-55) zu nennen.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in Zellkultur sind neben Polyadenylierungssequenzen wie z.B. aus Simian Virus 40 eukaryontische Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40..

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in Pflanzen sind in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, LEB4, USP, STLS1, B33, NOS; FBPaseP (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten, vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt sind Promotoren viralen Ursprungs wie der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294; Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant Mol Biol 1995, 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor als genetische Kontrollsequenz enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

19

Geeignet sind ferner Promotoren die eine gewebe- oder organspezifische Expression z.B. in Antheren, Ovarien, Blüten und Blütenorganen, Blättern, Schließzellen, Trichomen, Stengel, Leitgeweben, Wurzeln und Samen vermitteln. Ebenfalls geeignet sind hier neben
5 den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere solche Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor
10 aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern. Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bustos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumingens
15 (Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindepoteins
20 (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen Genet 1991, 225: 121-128; Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090).

Weitere als genetische Kontrollsequenzen geeignete Promotoren
25 sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise
30 der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blüten-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO
35 98/22593) oder spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nr U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676
40 können vorteilhaft verwendet werden.

Unter zusätzlichen Funktionselementen b) sind beispielhaft aber nicht einschränkend Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und sogenannte Affinitäts-Tags, fusioniert mit der
45 Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH direkt oder mittels eines Linkers optional enthaltend eine Protease-Schnittstelle zu verstehen. Weitere geeignete zusätzliche Funktionselemente sind Sequen-

20

zen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Peroxisom, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytoplasma, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt als Vektor oder den verwendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen.

Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette sowie davon abgeleitete Vektoren können zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien (z.B. der Gattung Synechocystes, Anabaena, Calothrix, Scytonema, Oscillatoria, Plectonema und Nostoc), Proteobakterium wie etwa Magnetococcus sp. MC1, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen und eukaryontischen, nicht humanen Zellen (z.B. Insektenzellen) mit dem Ziel der rekombinanten Herstellung der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH eingesetzt werden, wobei sich die Herstellung einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchen das Gen exprimiert werden soll, richtet.

Vektoren enthaltend

- 5 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 10 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2;
- 15 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- 25 Sollen neben den Nukleinsäuresequenzen weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

30

Hierbei kann das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), der Expressionskassette oder des Vektors in die entsprechenden Organismen (Transformation) prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

35

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) "Current protocols in molecular biology",

- 40 John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press

oder Guthrie et al. "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen. Bei

- 45 der Transformation von filamentösen Pilzen bieten sich zum einen die Herstellung von Protoplasten und Transformation mit Hilfe von PEG (Wiebe et al. (1997) Mycol. Res. 101 (7): 971-877; Proctor et

al. (1997) Microbiol. 143, 2538-2591), zum anderen die Transformation unter zur Hilfe nahme von *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot et al. (1998) Nat. Biotech. 16, 839-842) an.

- 5 Für dikotyle Pflanzen können die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden. Geeignete Methoden sind das biolistische Verfahren oder durch Protoplastentransformation (vergl. z.B. Willmit-
- 10 zer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch
- 5 *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant
- 20 Molec.Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben.

- Die Transformation mittels *Agrobakterien* sowie die für die Transformation zu verwendenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (Bevan et al., Nucl.
- 25 Acids Res. 12 (1984) 8711. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der *Agrobakterien* integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren
- 30 können nicht in *Agrobakterien* replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobakterien* replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker,
- 35 welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die *Agrobakterien* transformiert werden (; Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187) , EP A 0.120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley
- 40 et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287).

- Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al,
- 45 Plant Mol. Biol. 22(1993), 491-506; Hiei et al, Plant J. 6 (1994) 271-282; Deng et al; Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al, Plant Cell Reports 11,(1992) 76-80; May et al; Bio-

23

technology 13 (1995) 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992) 550-555; Ritchie et al; Transgenic Res. (1993) 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux; Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al; Biotechnology 11 (1992), 667-674; Ritala et al, Plant Mol. Biol 24, (1994) 317-325; Spencer et al, Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631) die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen ; die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0513849 A1; EP 0465875 A1; EP 0292435 A1; Fromm et al, Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al, Plant Cell 2 (1990), 603-618; Kozziel et al, Biotechnology 11 (1993) 194-200; Moroc et al, Theor Applied Genetics 80 (1990) 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al, s.o.; Weizen (Nehra et al, Plant J. 5 (1994) 285-297).

Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Die durch Transformation mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen einer Expressionskassette, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Vektor, enthaltend die vorstehend genannte Expressionskassette, hergestellten transgenen Organismen sowie die mittels Expression aus dem transgenen Organismus erhältliche rekombinante Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von transgenen Organismen enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionskas-

24

sette z.B. für die Bereitstellung rekombinanten Proteins und/oder die Verwendung dieser Organismen in in vivo Testsystemen.

Bevorzugte Organismen für die rekombinante Expression sind sind
5 neben Bakterien, Hefen, Moose, Algen, Pilze auch eukaryontische Zelllinien.

Bevorzugte Moose sind *Physcomitrella patens* oder weitere in Kryptogamen, Bd.2, Moose, Farne, 1991, Springer Verlag (ISBN
10 3540536515), beschriebene Moose.

Innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystes*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Scytonema*,
5 *Oscillatoria*, *Plectonema* und *Nostoc*, besonders bevorzugt *Synechocystis* oder *Anabena* bevorzugt.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

20 Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*, oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) beschriebene Pilze.

25 Bevorzugte Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Brassicaceae wie Raps, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlrarten oder Canola; Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika; Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat
35 oder Calendula; Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini, oder Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe oder verschiedene Baum-, Nuss- und Weinspecies.

Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet
40 gnet wie beispielsweise *C. elegans*.

Bevorzugt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren, die öffentlich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind.

45 Zur Verwendung in *E. coli* Bakterien sind die typischen vorteilhaften, kommerziell erhältlichen Fusions- und Expressionsvektoren pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988)

25

Gene 67:31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A, die pTrc-Vektoren (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) der "pKK233-2" von CLONTECH, Palo Alto, CA und die "pET"-, und die "pBAD"-Vektor-Serien von Stratagene, La Jolla zu nennen.

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYep-Sec1 (Baldari, et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), and pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate sowie die Vektoren des "Pichia Expression Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf9, Sf21 oder Hi5 Zellen, welche über rekombinante Baculoviren infiziert werden. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus Expressionssysteme "MaxBac 2.0 Kit" und "Insect Select System" von Invitrogen, Calsbad oder "BacPAK Baculovirus Expressionssystem" von CLONTECH, Palo Alto, CA. Insektenzellen eignen sich in besonderer Weise zur Überexpression eukaryontischer Proteine, da sie posttranslationale Modifikationen der Proteine durchführen, die in Bakterien und Hefen nicht möglich sind. Die Handhabung von Insektenzellen in Zellkultur sowie ihre Infektion zur Expression von Proteinen sind dem Fachmann bekannt und können in Analogie zu bekannten Methoden erfolgen (Luckow und Summers, Bio/Tech. 6, 1988, pp.47-55; Glover and Hames (eds) in DNA Cloning 2, A practical Approach, Expression Systems, Second Edition, Oxford University Press, 1995, 205-244).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich wie obenstehend erwähnt in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721.

26

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) Nature 329:840 oder Kaufman et al. (1987) EMBO J.

- 5 6:187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
- 10 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

- 5 Die transgenen Organismen, welche eine Nukleinsäuresequenz umfassend

enthalten, werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung beansprucht.

20

Sämtliche, oben beschriebenen Ausführungsformen der transgenen Organismen werden unter dem Begriff "erfindungsgemäßer transgener Organismus" zusammengefaßt.

- 25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in einem Verfahren zur Identifizierung von Testverbindungen mit herbizider Wirkung.

Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung die folgenden Schritte:

- i. Inkontaktbringen von Malat Dehydrogenase, bevorzugt von MDH mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen,
- 35 die die Bindung der Testverbindung(en) an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH erlauben; und
- ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt an die MDH aus i) bindet; oder
- 40 iii. Nachweis, ob die Testverbindung die enzymatische oder biologische Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH aus i) reduziert oder blockiert; oder

27

iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH reduziert oder blockiert.

5 Der Nachweis gemäß Schritt (ii) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, erfolgen. Hierbei kann entweder die Testverbindung oder das Enzym eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope, chemilumineszierende oder enzymatische Markierung. Beispiele für enzymatische Markierungen sind Meerrettich Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Luzifizierase. Die anschließende Detektion richtet sich nach der Markierung und ist dem Fachmann bekannt.

15 Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Troughput Screening, HTS) geeignet sind:

20 1. Über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11755) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren so konzipiert sein, dass eine durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay").

35 2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300).
40 Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Test-

verbindung an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.

5
3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums
10 des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH und den auf Bindung Tetsverbindung kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird.

20
4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem "Time of Flight" Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschritten kann man die an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt an die MDH gebundene Testverbindungen selektieren.

35
5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisiertes Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für
40 eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1993) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag

45

29

durchgeführt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt an die MDH aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.

Die über die oben genannten Verfahren 1 bis 5 identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein. Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

Auch besteht die Möglichkeit, über Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH mittels Röntgenstrukturanalyse weitere potentielle herbizide Wirkstoffe mittels "Molecular Modelling" zu detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden Auswertungen dieser Messungen, die Detektion einer Bindungsstelle im Protein sowie die Vorhersage möglicher Inhibitorstrukturen sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modelling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben genannten Verfahren identifizierten Verbindungen möglich.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische Aktivität einer Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH verglichen wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform des auf den Schritten i) und ii) basierenden Verfahrens besteht darin, dass

- i. eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt eine MDH in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH enthält, kultiviert wird;
- ii. die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

- iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH ermittelt wird.

Die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH enthaltende Lösung kann aus dem Lysat des ursprünglichen Organismus oder des transgenen, mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismus bestehen. Falls erforderlich kann die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH partiell oder vollständig über gängige Methoden aufgereinigt werden. Eine allgemeine Übersicht über gängige Techniken zur Reinigung von Proteinen sind beispielsweise in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben. Bei rekombinanter Darstellung kann eine Reinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins über nach dem Fachmann bekannten Affinitätschromatographie erfolgen.

Die für in vitro Verfahren benötigte Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH kann somit entweder mittels heterologer Expression aus einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus oder aus einem Organismus, der ein Enzym mit der enzymatischen Aktivität vorzugsweise biologischen einer Malatdehydrogenase enthält, isoliert werden, zum Beispiel aus einer unerwünschten Pflanze, wobei unter dem Begriff der unerwünschten Pflanze die eingangs erwähnten Spezies zu verstehen sind.

Zur Identifizierung von herbiziden Verbindungen wird nun die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH mit einer Testverbindung inkubiert. Nach einer Reaktionszeit wird die enzymatische Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH mit der enzymatischen Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH ermittelt. Bei Inhibition der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH beobachtet man eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht inhibierten erfindungsgemäßen Polypeptides, wobei eine Abnahme von mindestens 10%, vorteilhaft mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50% bis hin zu einer 100% Reduktion (Blockierung) erzielt wird. Bevorzugt mindestens 50% Hemmung bei Konzentrationen der Testverbindung von 10^{-4} M, bevorzugt bei 10^{-5} M, besonders bevorzugt von 10^{-6} M bezogen auf Enzymkonzentration im mikromolaren Bereich.

31

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH kann beispielsweise über einen Aktivitätstest erfolgen, in welchem die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) bzw. die Ab- oder Zunahme des Cofaktors 5 oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

10 Beispiele für geeignete Substrate sind z.B. Malat (-)-Tartrate(S,S), (S)-Malate, 2-Hydroxybutyrat, 2-Hydroxyglutarate 2-Hydroxymalonat, 2-Oxobutyrat, 2-oxoglutarat, Ketomalonat, L-Malat, meso-Tartrat(S,R), oxalacetat und für geeignete Cofaktoren NAD⁺, NADH, APAD, APADH. Je nach verwendeter Malat Dehydrogenase kann auch NADPH als Cosubstrat eingesetzt werden. Gegebenenfalls 15 können auch Derivate der vorstehend genannten Verbindungen verwendet werden, die eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope oder chemilumineszierende Markierung.

20 Die für den Aktivitätstest einzusetzenden Mengen an Substrat können zwischen 0.5-100 mM und Mengen an Cofaktor zwischen 0.1-5 mM bezogen auf 1-100 µg/ml Enzym liegen.

25 Die Bestimmung der Aktivität kann beispielsweise in Analogie zu dem von Gietl et al (1996, BBA 1274, 48-58) beschriebenen Verfahren erfolgen.

Des weiteren kann die Bestimmung der Aktivität in Schritt iii) des oben genannten Verfahrens

30 a) photometrisch über die Umwandlung von NADH zu NAD⁺; und/oder

b) photometrisch über die Umwandlung von NAD⁺ zu NADH erfolgt; oder

35 c) photometrisch über die Umwandlung von APAD zu APADH; oder
erfolgen.

40 Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und iii) basiert, besteht aus den folgenden Schritten:

45 i. Herstellung eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine glyoxsomale Malat Dehydrogenase umfassend

32

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66%, vorzugsweise 81% aufweist, ableiten läßt;

ii. Aufbringen einer Testverbindung auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testverbindung; und

iv. Selektion von Testverbindungen, die ein vermindertes Wachstum oder eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

Hierbei beträgt der Wachstumsunterschied der in Schritt iv) zur Selektion eines Inhibitors mit herbizider Wirkung mindestens 10%, vorzugsweise 20%, bevorzugt 30%, besonders bevorzugt 40% und ganz besonders bevorzugt 50%.

35.

Der transgene Organismus ist hierbei vorzugsweise eine Pflanze, Alge, ein Cyanobakterium z.B. der Gattung *Synechocystes* oder ein Proteobakterium wie etwa *Magnetococcus* sp. MC1, bevorzugt Pflanzen, die sich mittels gängiger Techniken transformieren lassen, wie *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana Tabacum*, Cyanobakterien die sich leicht transformieren lassen, wie z.B. *Synechocystis*, in welchen die für ein erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Sequenz über Transformation inkorporiert wurde. Diese transgenen Organismen weisen daher eine erhöhte Toleranz gegen Verbindungen auf, welche das erfindungsgemäße Polypeptid inhibieren. Hierbei können auch "knock-out"-Mutanten verwendet werden, bei denen das in diesem Organismus natürlich vorhandene analoge

33

Gen für Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH gezielt ausgeschaltet worden ist.

Die vorstehend genannte Ausführungsform des erfindungsgemäßen

5 Verfahrens kann jedoch auch zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung verwendet werden. Hierbei wird als transgener Organismus eine Pflanze eingesetzt. Das Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung umfasst somit die folgenden Schritte:

10

i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine glyoxsomale Malat Dehydrogenase umfassend

15

a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

20

c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

25

d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66%, vorzugsweise 81% aufweist, ableiten lässt;

30

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;

35 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und

40 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

Hierbei werden in Schritt iv) Testverbindungen selektiert, die ein verändertes Wachstum des nicht-transgenen Organismus bewirken
45 verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken. Unter verändertem Wachstum ist hierbei eine Hemmung des vegetativen Wachstums der Pflanzen zu verstehen, was sich insbesondere in

einer Reduzierung des Längenwachstums äußeren kann. Die behandelten Pflanzen weisen demgemäß einen gedrungenen Wuchs auf; außerdem ist eine dunklere Blattfärbung zu beobachten. Weiterhin ist unter verändertem Wachstum auch eine zeitliche Veränderung des Reifeverlaufs, eine Heummung oder Vermehrungen seitlicher Verzweigungen der Pflanzen, eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Entwicklungsstadien, eine Erhöhung der Standfestigkeit, das Wachstum größerer Mengen an Knospen, Blüten, Blättern, Früchten, Samenkörnern, Wurzeln und Knollen, eine Erhöhung des Zuckergehaltes in Pflanzen wie Zuckerrüben, Zuckerrohr sowie Zitrusfrüchten, des Proteingehaltes in Pflanzen wie Getreide oder Soja oder eine Stimulierung des Latexfluß an Gummibäumen zu verstehen. Die Detektion dieses veränderten Wachstums ist dem Fachmann bekannt.

15 Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testverbindungen in verschiedene Untergruppen zu teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testverbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.

Alle oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung werden im folgenden als "erfindungsgemäße Verfahren" bezeichnet.

35

Sämtliche, über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen können anschließend auf ihre herbizide oder wachstumsregulatorische Wirkung in vivo überprüft werden. Eine Möglichkeit zur Prüfung der Verbindungen auf herbizide Wirkung ist die Verwendung der Wasserlinse *Lemna minor* in Mikrotiterplatten. Als Parameter können Veränderungen des Chlorophyllgehalts und die Photosyntheseleistung gemessen werden. Es ist auch möglich, die Verbindung auf unerwünschte Pflanzen direkt zu applizieren, wobei die herbizide Wirkung z.B. über eingeschränktes Wachstum festgestellt werden kann.

35

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch vorteilhaft in Hochdurchsatzverfahren, sog. HTS durchgeführt werden, welches das parallele Testen einer Vielzahl verschiedener Verbindungen ermöglicht.

5

Im HTS bietet sich für die praktische Durchführung die Verwendung von Trägern an, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, einen oder mehrere die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthaltenden Vektoren, einen oder mehrere

- 10 transgene Organismen, welche mindestens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten oder eines oder mehrere (Poly)peptide codiert über die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Der verwendete Träger kann fest oder flüssig sein, ist bevorzugt fest, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte. Die vorstehend genannten Träger sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Gemäß der am weit verbreitetsten Technik werden 96-well, 384-well und 1536 well Mikrotiterplatten verwendet, die in der Regel Volumina von 200 µl umfassen können. Neben den Mikrotiterplatten sind die weiteren Bestandteile eines
- 20 HTS-Systems passend zu den entsprechenden Mikrotiterplatten wie viele Instrumente, Materialien, automatische Pipettiervorrichtungen, Robotoren, automatisierte Plattenleser sowie Plattenwascher kommerziell erhältlich.

- 25 Neben den auf Mikrotiterplatten basierenden HTS-Verfahren können auch sogenannte "free format assays" oder Testsysteme, die zwischen den Proben keine physischen Barrieren aufweisen, verwendet werden wie z.B. in Jayaickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 19 (1994) 161418; Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995); Salmon et al., Molecular Diversity 2 (1996), 5763 und US
- 30 5,976,813.

- 35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 500 g/mol, bevorzugt kleiner 400
- 40 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 300 g/mol. Verbindungen mit herbizider Wirkung weisen einem Ki-Wert kleiner 1 mM, bevorzugt kleiner 1 µM, besonders bevorzugt kleiner 0,1 µM ganz besonders bevorzugt kleiner 0,01 µM aufweisen.

36

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Auch diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt.

5

Die selektierte Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen. Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen mit herbizider Wirkung nicht negativ beeinträchtigen.

10

5 Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte α -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

20

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die selektierte Verbindungen können auch aus umfangreichen Substanzbibliotheken stammen.

25

0 Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 35 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder als Wachstumsregulatoren verwendet werden. Herbizide Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandsmengen auf. Die selektierten Verbindungen

40

45

dungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schäd-
pflanzen verwendet werden.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können se-
5 lektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende herbizide Zusam-
mensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kultur-
pflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt wer-
den. In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

- 10 *Allium cepa*, *Ananas comosus*, *Arachis hypogaea*, *Asparagus*
officinalis, *Beta vulgaris spec. altissima*, *Beta vulgaris spec.*
rapa, *Brassica napus var. napus*, *Brassica napus var. napo-*
brassica, *Brassica rapa var. silvestris*, *Camellia sinensis*,
Carthamus tinctorius, *Carya illinoensis*, *Citrus limon*, *Citrus*
15 *sinensis*, *Coffea arabica* (*Coffea canephora*, *Coffea liberica*),
Cucumis sativus, *Cynodon dactylon*, *Daucus carota*, *Elaeis*
guineensis, *Fragaria vesca*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*,
(*Gossypium arboreum*, *Gossypium herbaceum*, *Gossypium vitifolium*),
Helianthus annuus, *Hevea brasiliensis*, *Hordeum vulgare*, *Humulus*
20 *lupulus*, *Ipomoea batatas*, *Juglans regia*, *Lens culinaris*, *Linum*
usitatissimum, *Lycopersicon lycopersicum*, *Malus spec.*, *Manihot*
esculenta, *Medicago sativa*, *Musa spec.*, *Nicotiana tabacum*
(*N. rustica*), *Olea europaea*, *Oryza sativa*, *Phaseolus lunatus*,
Phaseolus vulgaris, *Picea abies*, *Pinus spec.*, *Pisum sativum*,
25 *Prunus avium*, *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Ribes sylestre*,
Ricinus communis, *Saccharum officinarum*, *Secale cereale*, *Solanum*
tuberosum, *Sorghum bicolor (s. vulgare)*, *Theobroma cacao*, *Tri-*
folium pratense, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Vicia faba*,
Vitis vinifera, *Zea mays*.

- 30 Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kul-
turen, die durch Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden
gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden.
Die Herstellung dieser Kulturen wird weiter unten beschrieben.

- 35 Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung
der oben bereits erwähnten herbiziden oder wachstumsregulatori-
schen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man selektier-
ten Verbindungen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutz-
40 mitteln formuliert.

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt ver-
sprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hoch-
prozentigen wässrigen, öligen oder sonstigen Suspensionen bzw.

- 45 Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten,
Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln
oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Verne-

beln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollte in jedem Fall möglichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen gewährleisten. Die herbiziden Zusammensetzungen enthalten eine herbizid wirksame Menge mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von herbiziden Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

- 10 Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhaltigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) können die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfsstoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es können
- 5 aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgierbare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzentrate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen
- 20 netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wetable) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder
- 25 eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhinderenden Überzug ("coating") versehen werden.

Prinzipiell sind unter dem Begriff "Hilfsmittel" folgende Verbindungsklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netzmittel, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

- SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Substanzen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate
- 40 können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften auf-
- 45

- geführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate),
Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967,
147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-
Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US
5 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US
5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman,
Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York,
1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell
Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann,
10 A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Fed-
eral Republic of Germany), 2001.

- Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die er-
findungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl
15 bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen
von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl,
ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ur-
sprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasser-
stoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphtha-
20 line oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate,
Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol,
Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B.
Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.
- 25 Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kiesel-
säuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk,
Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeenerde, Calcium- und Ma-
gnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel,
wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe
30 und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und
Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

- Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsge-
mäßigen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt,
35 wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen
Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Dibutylnapht-
thalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsul-
fonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie
Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fet-
40 talkoholglykolether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naph-
thalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte
des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und
Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooc-
tyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyg-
45 lykolether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fet-
talkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Poly-
oxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenalkylether, Laurylalko-

holpolyglykoetheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

Die Applikation der herbiziden Zusammensetzungen bzw. der selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachaufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

Beispiel 1: Erzeugung einer cDNA-Bibliothek im Pflanzentransformationsvektor

25

Zur Erzeugung einer cDNA-Bibliothek (im folgenden "binäre cDNA-Bank" genannt) in einem Vektor, der direkt für die Transformation von Pflanzen verwendet werden kann, wurde mRNA aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert und mit dem TimeSaver cDNA Synthese Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit T₁₂₋₁₈ Oligonucleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Größenfraktionierung und Ligation von EcoRI-NotI-Adaptoren nach Herstellerangaben und Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase

(Stratagene) wurde die cDNA-Population normalisiert. Hierzu wurde die Methode nach Kohci et al, 1995, Plant Journal 8, 771-776 vorgegangen, wobei die cDNA durch PCR mit dem Oligonukleotid N1 unter den in Tabelle 1 aufgeführten Bedingungen amplifiziert wurde.

40. Tabelle 1

| Temperatur [°C] | Zeit [sec] | Zyklennummer |
|-----------------|------------|--------------|
| 94 | 300 | 1 |
| 94 | 8 | 10 |
| 52 | 60 | |
| 72 | 180 | |

45

41

| | Temperatur [°C] | Zeit [sec] | Zyklennummer |
|----|-----------------|------------|--------------|
| 5 | 94 | 8 | 10 |
| | 50 | 60 | |
| | 72 | 180 | |
| | 94 | 8 | 10 |
| | 48 | 60 | |
| | 72 | 180 | |
| 10 | 72 | 420 | 1 |

Das erhaltene PCR-Produkt wurde an die Säulenmatrix des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) gebunden und mit 300 mM NaP-Puffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.04% SDS eluiert. Die DNA wurde 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 24 Stunden bei 60°C renaturiert. 50 µl der DNA wurden auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen und diese 3 Mal mit 1 ml 10 mM NaP-Puffer, pH 6.8 gewaschen. Die gebundene Einzelstrang-DNA wurde mit 130 mM NaP-Puffer, pH 6.8 eluiert, mit Ethanol gefällt und in 40 µl Wasser gelöst. Hiervon wurden 20 µl für eine weitere PCR-Amplifikation wie oben beschrieben verwendet. Nach einer weiteren Anreicherung von ssDNA wurde eine dritte PCR-Amplifikation wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung des Pflanzentransformationsvektors zur Aufnahme der wie oben beschrieben hergestellten cDNA-Population erfolgte über Restriktionsenzym-Verdau des Vektor pUC18 mit SbfI und BamHI, Reinigung des Vektorfragment gefolgt von Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase und Religation mit T4 DNA Ligase (Stratagene). Das so hergestellte Konstrukt wird im folgenden als pUC18SbfI- bezeichnet.

Der Vektor pBinAR wurde zunächst mit NotI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert, mit SbfI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert und im Anschluß mit EcoRI und HindIII gespalten. Das resultierende Fragment wurde in ein Derivat des binären Pflanzentransformationsvektors pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z, Maliga, P., (1994) Plant Mol Biol 25:989-994) ligiert, der eine Transformation von Pflanzen mittels Agrobakterium ermöglicht und eine Kanamycinresistenz in transgenen Pflanzen vermittelt, ligiert. Das hierbei erzeugte Konstrukt wird im folgenden als pSun12/35S bezeichnet.

pUC18SbfI- wurde als Template für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den Oligonucleotiden V1 und V2 (siehe Tabelle 2) und Pfu DNA Polymerase eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde in den mit SmaI gespalten pSun12/35S ligiert, wodurch pSunblues2

42

erzeugt wurde. Nach Spaltung mit NotI, Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) und Aufreinigung des Vektorfragmentes wurde pSunblues2 mit der normalisierten und ebenfalls mit NotI gespaltenen cDNA Population ligiert. Nach Transformation in E.coli XL1-blue (Stratagene) wurden die so erzeugte Klone in Mikrotiterplatten abgelegt. Die binäre cDNA-Bank enthält cDNAs in "Sense"- und in "Antisense"-Orientierung unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus 35s Promotors, die dementsprechend nach der Transformation in Tabakpflanzen zu "Co-suppressions"- und "Antisense"-Effekten führen können.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Nukleinsäuresequenz |
|----------------|--|
| N1 | 5'-AGAATTCGCGGCCGCT-3' |
| V1 (PWL93not) | 5'-CTCATGCGGCCGCGCAACGCAATTAATGTG-3' |
| V2 (pWL92) | 5'-TCATGCGGCCGCGAGATCCAGTTCGATGTAAC-3' |
| G1 (35S) | 5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3' |
| G2 (OCS) | 5'-GTAAGGATCTGAGCTACACAT-3' |

Beispiel 2: Transformation und Analyse von Tabakpflanzen

Ausgewählte Klone der binären cDNA-Bank wurden in Agrobacterium tumefaciens C58Cl:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788) und unter Streptomycin/Spectinomycin-Selektion inkubiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN mit dem Klon nt002035041r wurde eine in YEB-Medium auf OD600 = 0.8-1.6 verdünnte Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit der Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50mg/l Kanamycin, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2mg/l Naphtylelessigsäure und 1,6g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprossen wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Regenerierte Sprossen wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten. Auf diese Weise wurden transgene Pflanzen der Linie E_0000005869 erzeugt.

43

Die Integration der cDNA der Klone in das Genom der transgenen Linien wurde über PCR mit den Oligonukleotiden G1 und G2 (siehe Tabelle 2) und genomischer DNA, die aus den entsprechenden transgenen Linien präpariert wurde nachgewiesen. Hierzu wurde vorzugsweise TAKARA Taq-DNA Polymerase nach Herstellerangaben (MoBiTec, Göttingen) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der jeweils zur Transformation verwendete cDNA-Klon der binären cDNA-Bank als Template für eine PCR-Reaktion. PCR Produkte identischer Größe oder ggf. gleicher Spaltungsmuster, die nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen erhalten wurden, dienten als Nachweis der Integration der entsprechenden cDNA. Das Insert des Klons nt002035041r wurde auf diese Weise in den transgenen Pflanzen mit den oben genannten Phänotypen nachgewiesen.

- 15 Nach Transfer der Sprosse in Erde wurden die Pflanzen für 2-20 Wochen im Gewächshaus auf die Ausprägung von Phänotypen beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass transgene Pflanzen der Linie E_0000005869, in welchen das Insert von nt002035041r nachgewiesen wurde, ähnliche Phänotypen aufwiesen. Diese Pflanzen zeigten nach 20 2 Wochen starke Wachstumsretardierungen, sowie chlorotische Blätter und vereinzelt Nekrosen.

Beispiel 3 Sequenzanalyse des Klones

- 25 Zu Isolierung einer Volle Länge cDNA-Sequenz von nt002035041r (SEQ ID NO:#2) wurde das Smart-RACE kit (Clontech) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die SEQ ID NO:#2 von 1513 bp Länge codiert auf einem offenen Leseramen (nt 148-1221) von 960 nt Länge für ein Protein von 320 Aminosäuren.

- 30 Hiermit wurde erstmalig und überraschend gezeigt, dass die natürliche Expression von glyoxysomalen MDH codierenden Sequenzen essenziell für Pflanzen ist und eine verringerte Expression zu Schädigungen entsprechend den unter Beispiel 2 aufgeführten Phänotypen führt. Daraus folgt, dass sich Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH als Target für Herbizide eignet.

- 40 Die größte Homologie findet sich zu glyoxysomalen MDHs aus Wassermelone (P19446, Swissprot) mit 77,5 % Identität auf Nukleotidebene (90,7% Ähnlichkeit bzw. 85,4% Identität auf Proteinebene), Gurke, Arabidopsis, Soja und Reis. Die N-terminalen 38 Aminosäuren stellen vermutlich eine glyoxysomale Transitsequenz dar.

- 45 Beispiel 4: Expression in E.coli

44

Zur Erzeugung aktiven Nt-MDH Proteins mit pflanzlicher MDH-Aktivität wurde die Codierregion von Nt-MDH sowie MDH aus Arabidopsis (Genbank: At2g22780) in E. coli Bakterien überexprimiert. Dazu wurden Nt-MDH-Fragmente mittels spezieller Oligonukleotide und 5 Pfu-Ultra Polymerase (Stratagene) per PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pCR T7/CT TOPO (Invitrogen) ligiert (Konstrukte Nt1 und At1, Tabelle 7). Auf diese Weise wurden codierte Fusionsproteine mit C-terminalen Hexahistidin-tag erzeugt. Bei der Klonierung wurde durch die Verwendung der angegebenen Oligonucleotide 10 tude eine N-terminal verkürzte Version der MDH erzeugt, um die glyoxysomale Transitsequenz, die einer funktionellen Expression entgegenstehen könnte auszuschließen. Dabei wurde von der Transitsequenz der glyoxysomalen MDH aus Wassermelone ausgegangen (Gietl. Et al. 1996, BBA 1274, 48-58). Die PCR wurde nach Standardbedingungen (z.B. nach Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular 5 cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press) in 36 Zyklen durchgeführt, wobei die Annealingtemperaturen zwischen 44 und 55°C lagen und für die Polymerisationszeit je 60sec pro 1000bp betrug. Die Template sowie die für die jeweiligen 20 Template verwendeten Primer sowie Annealingtemperaturen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

| | | | |
|----|---------------|----------------------|--|
| 25 | Konstrukt | Annealing-Temp. [°C] | Primer (Nukleinsäuresequenz) |
| | Nt-gMDH-E1(1) | 53 | 5'-ATGAGGGCGAAAGGGGG-3' 5'-TTTCTTTACAAAGTTGACACCCTTC-3' |
| | At-gMDH-E1(2) | 56 | 5'-ATGCG-GGCAAAGGTGG-3' 5'-TTTCTTCGCAAAGGTAA-CACC-3' |

(1) Templat: Nicotiana tabacum cDNA-Bank

(2) Templat: Arabidopsis thaliana cDNA-Bank

35 Die in der PCR erhaltenen Produkte wurden in den Vektor pCR T7/CT TOP ligiert und in E. coli transformiert. Die Expression wurde in E. coli BL21(DE3) Stämmen wie BL21(DE3)pLyss oder BL21(DE3)pLyse (Invitrogen), BL21-CodonPlus(DE3) oder BL21-CodonPlus(DE3)RIL (Stratagene) nach Induktion mit IPTG durchgeführt. Dazu wurde 40 nach Standardprotokollen (Invitrogen) vorgegangen.

Die Expressionsprodukte Nt-gMDH-E1 und At-gMDH-E1 wurden über Ni-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben (Qiagen) vorgegangen.

45 Beispiel 5: in vitro Testsysteme

45

Die Enzymaktivität der gMDH kann nach Huang et al. (1974, Plant Physiol 54, 364-368) aus Präparationen pflanzlicher Microbodies gemessen werden. Es bietet sich jedoch an, die wie oben beschreiben in E.coli exprimierten und aufgereinigten Proteine einzusetzen, um Hintergrundaktivitäten cytosolischer und Mitochondrialer MDHs zu minimieren.

Die Messung der enzymatischen Aktivität der gMDH aus Beispiel 3 wurde über die Umsetzung von NAD⁺ zu NADH erfolgte photometrisch bei 340nm nach Gietl et al. (1996, BBA 1274, 48-58). Dieser Assay kann im Mikrotiterplatten Maßstab durchgeführt werden.

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verwendung von Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Malat Dehydrogenase durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche:
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
 - a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
 - b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
 - c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten lässt;
- umfasst.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Malat Dehydrogenase um eine glyoxysomalen Malat Dehydrogenase handelt, welche durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird umfassend:
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
 - b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
 - c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder

2

- 5 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

4. Pflanzliche Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine glyoxysomalen Malat Dehydrogenase umfassend:

- 10 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

- 15 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

- 20 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2; oder

- 25 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

- 30 5. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide kodiert von einem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4.

- 35 6. Verfahren zur Detektion funktioneller Analoga der SEQ ID NO:2

- a) durch Herstellung einer Sonde gefolgt von anschließenden Durchsuchen einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Spezies; oder

- 40 b) einer Computer-Recherche nach analogen Sequenzen in elektronischen Datenbanken.

7. Expressionskassette umfassend

3

a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder

b) zusätzliche Funktionselemente; oder

c) eine Kombination aus a) und b).

8. Vektor umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 7.

9. Transgener Organismus umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase gemäß Anspruch 4, eine Expressionskassette gemäß Anspruch 7 oder einen Vektor gemäß Anspruch 8 ausgewählt aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen.

10. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:

i. Inkontaktbringen von Malat Dehydrogenase mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an das Nukleinsäuremolekül oder an die glyoxysomalen Malat Dehydrogenase erlauben; und

ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die Malat Dehydrogenase aus i) bindet; oder

iii. Nachweis, ob die Testverbindung die enzymatische oder biologische Aktivität der Malat Dehydrogenase aus i) reduziert oder blockiert; oder

iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der Malat Dehydrogenase aus i) reduziert oder blockiert.

11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Malat Dehydrogenase durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche

a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID

4

NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt;

umfasst.

5

12. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Malat Dehydrogenase eine glyoxysomale Malat Dehydrogenase ist und durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche

10

a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder

15

b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt;

umfasst.

20

13. Verfahren nach Anspruch 10, 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische oder biologische Aktivität der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten glyoxysomalen Malat Dehydrogenase mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten glyoxysomalen Malat Dehydrogenase verglichen wird.

25

30

14. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass

35

i. Malat Dehydrogenase entweder in einem transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß Malat Dehydrogenase enthält, kultiviert wird;

40

ii. die Malat Dehydrogenase aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

45

iii. eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische Aktivität der Malat Dehydrogenase aus Schritt a) reduziert oder blockiert, wobei die enzymatische Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase

5

se mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase verglichen wird.

15. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14 dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

i. Herstellung eines transgenen Organismus nach Anspruch 7 oder eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Malat Dehydrogenase umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% ableiten läßt;

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps; und

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testsubstanz; und

iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein vermindertes Wachstum oder eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem pflanzlichen Organismus, einem Cyanobakterium oder einem Proteobakterium durchgeführt wird.

17. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase umfassend

a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der

6

SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt;

- 5 ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
- 10 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und
- 15 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird.
- 20 19. Träger, der eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 2, oder eine oder mehrere Expressionskassetten nach Anspruch 5, einen oder mehrere Vektoren nach Anspruch 6, einen oder mehrere Organismen nach Anspruch 7 oder eines oder mehrere (Poly)peptide nach Anspruch 3 aufweist.
- 25 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird unter Verwendung eines Trägers gemäß Anspruch 19.
- 30 21. Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, 18 und 20.
- 35 22. Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über das Verfahren nach Anspruch 17, 18 oder 20.
23. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man
- 40 a) eine Verbindung mit herbizider Wirkung über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 10 bis 16, 18 und 20 oder eine Verbindung mit wachstumsregulatorischer Wirkung nach Anspruch 17, 18 oder 20 identifiziert; und

7

- b) diese Verbindung zusammen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung formuliert.

5 24. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/
oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch ge-
kennzeichnet, daß man mindestens einen Inhibitor der Malat-
Dehydrogenase gemäß Anspruch 21 oder 22 oder eine agrochemi-
sche Zusammensetzung enthaltend einen Inhibitor der Malat-De-
10 hydrogenase gemäß Anspruch 21 oder 22 auf Pflanzen, deren Le-
bensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.

25. Verwendung eines Inhibitor der Malat-Dehydrogenase gemäß An-
spruch 21 oder 22 oder einer agrochemische Zusammensetzung
enthaltend einen Inhibitor der Malat-Dehydrogenase gemäß An-
5 spruch 21 oder 22 in einem Verfahren nach Anspruch 24.

20

25

35

40.

45

Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Malat Dehydrogenase, welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt und durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent dieser Nukleinsäuresequenz kodiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden neue Nukleinsäuresequenzen umfassend die SEQ ID NO:2 sowie funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:2 bereitgestellt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend genannten Malat Dehydrogenase sowie deren funktioneller Äquivalente in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung sowie die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

20

25

30

35

40

45

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> glyoxysomale Malatdehydrogenase

<130> MDH

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 673

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 1

gcgggccgcta aacctccttg ttcttttacg ccagaggaag ctgaatatatt aacatctcgt 60
atacaaaatg ggggaactga agttgttgag gcaaaagctg gtgctgggtc ggcaactctc 120
tctatggcat atgctgcggt taaatttgcc gacgcatgtt tgcattggatt gagaggagat 180
gctggcattg tagaatgtgc ctttgtgtct tctcaggtga ctgaacttcc atttttcgca 240
tcaaaagtat ggcttggccg caacggagtt gaagaaatat acccccttgg tcccctaaat 300
gaatacgaga ggtctgggct tgagaaggca aggaaagagt tggcaacaag tggtcagaag 360
ggtgtcaact ttgtaaagaa atgagcagac agctacatga cttccaaaag atgcttttat 420
gtgggctata tatctcaaat ccgcagttcc agaaaataag agtagtttct ttcttgtatt 480
aaagggcaaa tcctgttcta attttctata gattgatgcc ttggtgcaga aaataaatgt 540
actatttggc catctaaaat aacaacagtc cccagtgcac gttggacttg caaagtatta 600
catcctttga agcaagggct tggtatggac tttttgacag tatggatatt taaagggctt 660
ggagagcggc cgc 673

<410> 2

<411> 1505

<412> DNA

<413> Nicotiana tabacum

<420>

<421> CDS

<422> (148)..(1221)

<400> 2

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg ggggggaaac 60
aaaattcaat tacttacctt gattttctact acctctcttt ctcatcataa ttcaaacaca 120
caaattctca agcõcaagtc ttagaat atg cag aac ggt gca gag acc tat cga 174
Met Gln Asn Gly Ala Glu Thr Tyr Arg

1

5

cga atg gcc acc atc tca gct cac ctt aac ccc tct cct tct tct cat 222
Arg Met Ala Thr Ile Ser Ala His Leu Asn Pro Ser Pro Ser Ser His

10

15

20

25

2

| | |
|---|-----|
| cag atg gag gga ggt gtg ggt ttg agc cga gct aat tgc agg gcg aaa | 270 |
| Gln Met Glu Gly Gly Val Gly Leu Ser Arg Ala Asn Cys Arg Ala Lys | |
| 30 35 40 | |
| ggg ggt tct cca gga ttc aaa gtc gcg atc ttg ggt gct gca gga ggt | 318 |
| Gly Gly Ser Pro Gly Phe Lys Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Gly Gly | |
| 45 50 55 | |
| att ggt cag cca ctt gct atg ctt atg aaa acg aat cca ctg gtt tca | 366 |
| Ile Gly Gln Pro Leu Ala Met Leu Met Lys Thr Asn Pro Leu Val Ser | |
| 60 65 70 | |
| gtt ctg cat ctt tat gat gtt gcc aat act cct ggt gta act gct gac | 414 |
| Val Leu His Leu Tyr Asp Val Ala Asn Thr Pro Gly Val Thr Ala Asp | |
| 75 80 85 | |
| att agc cac atg gac act ggt gcc gtg gta cgt ggt ttt cta ggg cct | 462 |
| Ile Ser His Met Asp Thr Gly Ala Val Val Arg Gly Phe Leu Gly Pro | |
| 90 95 100 105 | |
| caa caa ttg gaa gat gct ctc act ggc atg gac ctt gta ata atc cct | 510 |
| Gln Gln Leu Glu Asp Ala Leu Thr Gly Met Asp Leu Val Ile Ile Pro | |
| 110 115 120 | |
| gct ggt gtt cct aga aaa cca ggc atg aca aga gat gat ctt ttc aac | 558 |
| Ala Gly Val Pro Arg Lys Pro Gly Met Thr Arg Asp Asp Leu Phe Asn | |
| 125 130 135 | |
| atc aat gca gga att gtg agg act tta tgt gaa gga att gcc aag tgc | 606 |
| Ile Asn Ala Gly Ile Val Arg Thr Leu Cys Glu Gly Ile Ala Lys Cys | |
| 140 145 150 | |
| tgt cct aag gcc att gtt aac ata att agt aat cct gtt aac tct aca | 654 |
| Cys Pro Lys Ala Ile Val Asn Ile Ile Ser Asn Pro Val Asn Ser Thr | |
| 155 160 165 | |
| gta cca att gct gca gag gtt ttc aag aag gct ggc acc ttt gat ccg | 702 |
| Val Pro Ile Ala Ala Glu Val Phe Lys Lys Ala Gly Thr Phe Asp Pro | |
| 170 175 180 185 | |
| agg aga ctg ttg ggc gtg aca atg ctt gat att gtc aga gcc aat aca | 750 |
| Arg Arg Leu Leu Gly Val Thr Met Leu Asp Ile Val Arg Ala Asn Thr | |
| 190 195 200 | |
| ttt gtg gct gaa gtt ttg ggg ctt gat cct agg gaa gtg gat gtt cca | 798 |
| Phe Val Ala Glu Val Leu Gly Leu Asp Pro Arg Glu Val Asp Val Pro | |
| 205 210 215 | |
| gtt gtg ggg ggt cat gct ggc gtt aca att cta cct ctt ctt tcc cag | 846 |
| Val Val Gly Gly His Ala Gly Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln | |
| 220 225 230 | |
| gtt aaa cct cct tgt tct ttt acg cca gag gaa act gaa tat tta aca | 894 |
| Val Lys Pro Pro Cys Ser Phe Thr Pro Glu Glu Thr Glu Tyr Leu Thr | |
| 235 240 245 | |

3

tct cgt ata caa aat ggg gga act gaa gtt gtt gag gca aaa gct ggt 942
Ser Arg Ile Gln Asn Gly Gly Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly
250 255 260 265

gct ggt tcg gca act ctc tct atg gca tat gct gcg gtt aaa ttt gcc 990
Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ser Met Ala Tyr Ala Ala Val Lys Phe Ala
270 275 280

gac gca tgt ttg cat gga ttg aga gga gat gct ggc att gta gaa tgt 1038
Asp Ala Cys Leu His Gly Leu Arg Gly Asp Ala Gly Ile Val Glu Cys
285 290 295

gcc ttt gtg tct tct cag gtg act gaa ctt cca ttt ttc gca tca aaa 1086
Ala Phe Val Ser Ser Gln Val Thr Glu Leu Pro Phe Phe Ala Ser Lys
300 305 310

gca cgg ctt ggc cgc aac gga gtt gaa gaa ata tac ccc ctt ggt ccc 1134
Arg Leu Gly Arg Asn Gly Val Glu Glu Ile Tyr Pro Leu Gly Pro
315 320 325

cta aat gaa tac gag agg tct ggg ctt gag aag gca aag aaa gag ctg 1182
Leu Asn Glu Tyr Glu Arg Ser Gly Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu Leu
330 335 340 345

gca aca agt gtt cag aag ggt gtc aac ttt gta aag aaa tgagcagaca 1231
Ala Thr Ser Val Gln Lys Gly Val Asn Phe Val Lys Lys
350 355

gctacatgac ttccaaaaga tgcttttatg tgggctatat atctcaaata cgcagttcca 1291
gaaaataaga gtagtttctt tcttgtatta aaggggcaaat cctgttctaa ttttctatag 1351
attgatgcct tgggtgcagaa aataaatgta ctatttggtc atctaaaata acaacagtcc 1411
gtgcatg ttggacttgc aaagtattac atcctttgaa gcaagggctt gttatggact 1471
ttgacagt atggatatat aaagggttg gaga 1505

<210> 3

<211> 358

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 3

Met Gln Asn Gly Ala Glu Thr Tyr Arg Arg Met Ala Thr Ile Ser Ala
1 5 10 15

His Leu Asn Pro Ser Pro Ser Ser His Gln Met Glu Gly Gly Val Gly
20 25 30

Leu Ser Arg Ala Asn Cys Arg Ala Lys Gly Gly Ser Pro Gly Phe Lys
35 40 45

Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Pro Leu Ala Met
50 55 60

4

Leu Met Lys Thr Asn Pro Leu Val Ser Val Leu His Leu Tyr Asp Val
 65 70 75 80

Ala Asn Thr Pro Gly Val Thr Ala Asp Ile Ser His Met Asp Thr Gly
 85 90 95

Ala Val Val Arg Gly Phe Leu Gly Pro Gln Gln Leu Glu Asp Ala Leu
 100 105 110

Thr Gly Met Asp Leu Val Ile Ile Pro Ala Gly Val Pro Arg Lys Pro
 115 120 125

Gly Met Thr Arg Asp Asp Leu Phe Asn Ile Asn Ala Gly Ile Val Arg
 130 135 140

Thr Leu Cys Glu Gly Ile Ala Lys Cys Cys Pro Lys Ala Ile Val Asn
 145 150 155 160

Ile Ile Ser Asn Pro Val Asn Ser Thr Val Pro Ile Ala Ala Glu Val
 165 170 175

Phe Lys Lys Ala Gly Thr Phe Asp Pro Arg Arg Leu Leu Gly Val Thr
 180 185 190

Met Leu Asp Ile Val Arg Ala Asn Thr Phe Val Ala Glu Val Leu Gly
 195 200 205

Leu Asp Pro Arg Glu Val Asp Val Pro Val Val Gly Gly His Ala Gly
 210 215 220

Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Lys Pro Pro Cys Ser Phe
 225 230 235 240

Thr Pro Glu Glu Thr Glu Tyr Leu Thr Ser Arg Ile Gln Asn Gly Gly
 245 250 255

Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ser
 260 265 270

Met Ala Tyr Ala Ala Val Lys Phe Ala Asp Ala Cys Leu His Gly Leu
 275 280 285

Arg Gly Asp Ala Gly Ile Val Glu Cys Ala Phe Val Ser Ser Gln Val
 290 295 300

Thr Glu Leu Pro Phe Phe Ala Ser Lys Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly
 305 310 315 320

Val Glu Glu Ile Tyr Pro Leu Gly Pro Leu Asn Glu Tyr Glu Arg Ser
 325 330 335

Gly Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu Leu Ala Thr Ser Val Gln Lys Gly
 340 345 350

Val Asn Phe Val Lys Lys
 355

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.